

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 18 年度博士課程進学
氏名 前田千晶
指導教員 塩田邦郎

論文題目 Stage- and sex-specific epigenetic patterns in mammalian development
(エピゲノム変化を基にした哺乳類性差の生物医学研究)

序論

細胞は、その種類や分化段階に応じて発現する遺伝子と発現しない遺伝子を使い分けている。分化した細胞では、遺伝子の使い分け機構は細胞分裂を繰り返しても維持される。エピジェネティクス制御系は、膨大な DNA の塩基配列のカatalogから、必要な情報を選択し、記憶する仕組みである。DNA のメチル化は、エピジェネティクス制御系の中心的な機構であり、正常な個体発生に必須のメカニズムである。

種々の疾患における罹患率や症状、化合物に対する反応性等において、雌雄による差が報告されている。これらの雌雄差の一部は、ホルモンの影響によると考えられているが、ゲノムレベルでの性差については明らかではない。ヒトやマウスでは、雄の細胞は XY 染色体を持つのに対し、雌の細胞は 2 本の X 染色体をもつ。性染色体からの遺伝子発現は雌雄によって差が生じるが、染色体の違いとゲノム情報の使い分け、雌雄の表現型の確立については多くの部分が未知である。本研究では、発生と雌雄差における DNA メチル化の重要性を 3 つのテーマに沿って明らかにした。

第一章 生殖細胞の発生と性差のエピジェネティクス

～ヒストン *H1foo* 遺伝子の卵特異的非メチル化領域～

哺乳類では、その生殖細胞形成において、雌雄によって異なるヒストン H1 を使い分けている。ヒストン *H1foo* は、雌の生殖細胞に特異的なヒストンサブタイプであり、卵核胞期から受精後の 2 細胞期までの限られた時期にのみ発現する。本章では、雌雄の生殖細胞における DNA メチル化パターンの形成と遺伝子発現との相関を明らかにするため、*H1foo*

遺伝子領域をモデルとして解析を行った。はじめに、*Hlfoo* を発現していない胚性生殖細胞 (EG 細胞) に DNA メチル化阻害剤である 5-アザデオキシシチジンを添加したところ、濃度依存的に *Hlfoo* の発現が上昇し、DNA メチル化が *Hlfoo* 遺伝子の発現抑制に関与することが示唆された。成体マウスの未受精卵、精子、および脳や肝臓を含む体細胞で *Hlfoo* 遺伝子上流域の DNA メチル化状態を調べた結果、未受精卵でのみ低メチル化状態にある、組織特異的メチル化可変領域 (Tissue-dependent and differentially methylated region: T-DMR) を発見した。卵特異的な非メチル化領域が発生の過程でどのように形成されるのかを明らかにするため、胎仔の細胞を用いてこの領域のメチル化状態を解析した。胎仔においては、生殖細胞、体細胞のいずれにも *Hlfoo* の発現は見られず、体細胞では胎生 9.5 日からすでに雌雄ともに T-DMR の高メチル化が見られた。これに対し、胎生 9.5 日から胎生 15.5 日において雌雄の生殖細胞はともに低メチル化状態にあった。さらに、胎生 18.5 日において雄の生殖細胞でのみ T-DMR が高度にメチル化され、精子と同等の高メチル化状態を示した。これらのことから、*Hlfoo* 遺伝子領域においては生殖細胞系列と体細胞系列では DNA メチル化による強固な遺伝子抑制状態が形成される時期が異なることがわかった。さらに、雌の生殖細胞では、発生段階のどの時期においても *Hlfoo* T-DMR は低メチル化状態を示し、非メチル化のサーキットを形成している可能性が示された。

第二章 脳の性差のエピジェネティクス

脳は、発生過程においてダイナミックな形態変化および遺伝子発現の変化が起きることが知られている。一方、生殖細胞系列と異なり、雌雄による形態、機能、遺伝子発現等の差は顕著ではない。そこで、本章では、脳における雌雄差の有無を明らかにすることを目的とし、雌雄の成体脳、肝臓、および ES 細胞を用いて網羅的な DNA メチル化プロファイルを取得した。方法として、本研究室で開発された D-REAM 法を用いた。D-REAM 法は、メチル化感受性制限酵素の認識部位のメチル化状況をタイリングアレイのシグナルに反映させることができる系であり、マウスの約 3 万遺伝子のプロモーター領域をタイリングしたアレイを用いて解析を行った。成体脳においては、多数の領域で雌雄によるシグナルの差が得られ、このうち X 染色体上に存在する多くの領域については X 染色体不活性化の影響が示唆された。一方、X 染色体上においても、領域によってメチル化傾向に差が検出され、T-DMR が形成されていると考えられた。また、常染色体上にも雌雄差を示す領域が多数存在し、雄の脳で雌に比べて低メチル化状態にある領域については、CpG アイランドをもつ遺伝子が濃縮される傾向があった。

第三章 疾患の性差のエピジェネティクス

～Rett 症候群における DNA メチル化異常～

性染色体上の遺伝子変異が関連した疾患では、雌雄により症状の差が現れる場合が多い。Rett 症候群は、約 1 万 5 千人に 1 人に発症する神経発達疾患であり、患者の約 9 割は X 染色体上の *MeCP2* 遺伝子に変異を持つ。男児の患者は出生前後に死亡する割合が高いのに対し、変異をヘテロにもつ女児は出生前後は見かけ上正常である。患者は生後 6-18 ヶ月までは比較的正常的な成長および言語・運動機能の発達を遂げるが、その後これらの能力が退行し、失行症、自閉傾向、呼吸障害等、様々な症状を呈する。*MeCP2* は脳において高発現し、メチル化シトシンに結合する性質を持つことから、その欠損は脳のエピゲノムに影響するという仮説を立てた。本章では、*MeCP2* 遺伝子欠損マウスの脳において DNA メチル化異常の有無を解析し、エピジェネティクスの観点から Rett 症候群の病態を解明することを目的とした。*MeCP2* 欠損マウスの雄は生後約 2 ヶ月で発症し、死に至るのに対し、雌は症状が軽く、多くは寿命を全うする。そこで、本章では神経症状発症後の雄マウスおよびコントロール雄マウスの脳を用いて D-REAM 解析を行い、ゲノムワイドな DNA メチル化情報を取得した。興味深いことに、*MeCP2* 欠損脳のメチル化プロファイルを、胎生 14.5 日齢の正常胎仔脳のメチル化プロファイルと比較したところ、両者は多数の候補遺伝子で共通したメチル化状態を示すことが示唆された。両者に共通する T-DMR について、D-REAM 解析を行った *MeCP2* 欠損脳を用いて詳細に解析したところ、コントロールと比べて高メチル化または低メチル化を示す遺伝子が複数同定された。そこで、これらの領域を 6 個体の欠損雄マウス脳およびそのコントロールで解析した。その結果、すべての欠損個体で共通した変異がみられるのではなく、同定された領域に関して差がある個体とない個体が存在することが分かった。また、*MeCP2* 欠損アレルをヘテロにもつ雌マウスでは、これらの領域にメチル化異常は検出されなかった。さらに、1 個体の欠損雄マウスについて、分裂停止後の神経細胞とその他の細胞を FACS を用いて分画し、メチル化解析を行った。神経細胞の分画においては、同定された領域についていずれもメチル化の差が検出されたことから、DNA メチル化異常は神経細胞に由来することが示された。これらの結果は、雌雄の *MeCP2* 欠損マウスの病態・発症時期が個体により異なっていることと符合する。また、雄マウスでは、雌マウスに比べ重篤であることも矛盾しない。このように、*MeCP2* 欠損により、脳に DNA メチル化異常が生じることが明らかとなった。このことは、エピジェネティクス系によるゲノムの使い分けが不十分であることを示唆している。胎仔脳 T-DMR をもつ遺伝子と *MeCP2* 欠損 T-DMR をもつ遺伝子を全体として比較すると、CpG アイランドの有無や Gene Ontology 解析において高い共通性が見いだされた。以上のこと

から、*MeCP2* 欠損動物では、成体脳のエピゲノムは胎仔型に近いことが示唆される。この発見は、*Rett* 症候群の病態成立の新たな視点となる。

総括

本研究では、雌雄において DNA メチル化パターンの形成にどのような差異があるのかを生殖細胞と脳という二つのモデルにおいて検討した。生殖細胞においても、脳においても、DNA メチル化パターンは、発生段階および雌雄に特異的であった。*Hlfoo* 遺伝子領域では、雌雄の生殖細胞は遺伝子発現の有無にかかわらず、胎生初期には低メチル化状態にあることが示された。雌雄による差は胎生 18.5 日齢ではじめて観察され、この領域の高メチル化は遺伝子発現抑制に寄与することが示唆された。また、脳、肝臓、ES 細胞における網羅的な DNA メチル化解析から、これらの組織においても雌雄差を示す多数の領域が検出された。脳における時期特異的な T-DMR は性染色体にも形成され、X 染色体における T-DMR の形成と X 染色体不活性化は密接に関係していることが示唆された。また、*Rett* 症候群のモデルマウスの解析から、*MeCP2* 欠損により脳の DNA メチル化パターンに異常が生じること、またそのメチル化変異の傾向は、全体として胎仔脳のメチル化プロファイルに類似性を示すことが明らかとなった。*MeCP2* 欠損マウス脳におけるメチル化異常は、発生過程に形成された DNA メチル化パターンが、成長後に時間差で影響を及ぼす可能性も示している。本研究を通じて、発生過程における DNA メチル化変化には雌雄差が浮き彫りとなり、疾患における雌雄差などを考える上でも重要な知見が得られた。